

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-146894

(P2000-146894A)

(43)公開日 平成12年5月26日 (2000.5.26)

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 27/327

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/483

33/50

識別記号

Z N A

F I

G 0 1 N 27/30

3 5 1 2 G 0 4 5

C 1 2 Q 1/68

A 4 B 0 2 4

G 0 1 N 33/483

F 4 B 0 6 3

33/50

P

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数7 FD (全8頁)

(21)出願番号

特願平10-328872

(22)出願日

平成10年11月4日 (1998.11.4)

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年9月30日~10月2日 社団法人高分子学会開催の「第47回(1998年)高分子討論会」において文書をもって発表

(71)出願人

富士写真フィルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72)発明者

竹中 繁織

福岡県古賀市舞の里4-23-21

(73)発明者

高木 誠

福岡県福岡市博多区昭南町3-4-29

(74)代理人

弁理士 柳川 泰男

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FB01 FB02 FB05

4B024 AA20 CA09 HA12

4B063 QA01 QA13 QQ42 QR03 QR32

QR51 QR55 QR63 QR64 QS28

QS34 QS36 QX04

(54)【発明の名称】 DNAの増感型検出方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、プローブDNAと試料DNAとを、インターラーゲータ存在下に接触させ、電極の電流を測定することによって、特定の配列を有するDNAを検出する方法を応用し、より検出感度の高い方法を提供することにある。

【解決手段】 電極に固定されてなるプローブDNAと一本鎖に解離させた試料DNAとを、基質、その基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素、および電気活性縫い込み型インターラーゲータの存在下に接触させ、該プローブDNAと該試料DNAとによって形成されたハイブリッドDNAに結合した該インターラーゲータに流れる電流を、還元型に変化した酸化酵素と電極との間の電子移動によって増幅させ、その電流を測定することによって特定の塩基配列を有するDNAを検出することからなるDNAの増感型検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 電極に固定されたプローブDNAと一本鎖に解離させた試料DNAとを、基質、その基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素、および電気化学活性縫い込み型インターラーケータの存在下に接触させ、該プローブDNAと該試料DNAとの結合によって形成されたハイブリッドDNAに結合した該インターラーケータに流れる電流を、還元型に変化した酸化酵素と電極との間の電子移動によって増幅させ、その電流を測定することによって特定の塩基配列を有するDNAを検出することからなるDNAの増感型検出方法。

【請求項2】 ハイブリッドDNAに、基質、その基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素、および電気化学活性縫い込み型インターラーケータを接触させ、ハイブリッドDNAに結合した該インターラーケータに流れる電流を、還元型に変化した酸化酵素と電極との間の電子移動によって増幅させ、その電流を測定することによってハイブリダイズした試料DNAの相補性を検出することからなるDNAの増感型検出方法。

【請求項3】 プローブDNAの塩基配列が既知であって、そのプローブDNAを使用することを特徴とする請求項1に記載の増感型DNAの検出方法。

【請求項4】 基質がグルコースもしくはコレステロールであって、その基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素がそれぞれグルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼであることを特徴とする請求項1もしくは2の内の何れかの項に記載のDNAの増感型検出方法。

【請求項5】 電気化学活性縫い込み型インターラーケータが、酸化還元活性を有する化合物であることを特徴とする請求項1もしくは2の内の何れかの項に記載のDNAの増感型検出方法。

【請求項6】 電気化学活性縫い込み型インターラーケータが、フェロセン修飾電気化学活性縫い込み型インターラーケータであることを特徴とする請求項1、2もしくは4の内の何れかの項に記載のDNAの増感型検出方法。

【請求項7】 一本鎖に解離させた試料DNAを、 10^{-18} モル乃至 10^{-12} モルの範囲の量で使用することを特徴とする請求項1に記載のDNAの増感型検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料DNAから特定の配列を有するDNAを検出する方法に関するもので、ハイブリダイゼーション法を利用した発明である。

【0002】

【従来の技術】 生物学、医学分野での遺伝子解析においては、特定の配列を有するDNAを検出する方法として、ハイブリダイゼーション法が用いられている。

【0003】 この中でも特に、目的とする遺伝子を特異的に検出する方法として、サザンハイブリダイゼーショ

ン法（サザンプロッティング法）が一般的に用いられている。サザンハイブリダイゼーション法では、まず試料DNAを一種類以上の制限酵素でフラグメントとし、アガロースゲル電気泳動あるいはポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけてその分子量サイズによって分画ごとに分離する。次に、分離した試料DNAを一本鎖DNAに変性した後、ナイロン・フィルターもしくはニトロセルロース・ペーパー等に固定化する。そして、その変性された一本鎖DNAと、放射性同位元素（以下、RIという）でラベルされた塩基対を形成する相補的な一本鎖DNA（以下、プローブDNAという）とをハイブリダイズさせた後、フィルターを洗浄する。洗浄後、該フィルター等をオートラジオグラフにかけ、現像することによってプローブDNAとハイブリダイズする特定の配列を有するDNAを検出することができる。

【0004】 しかし、上記のサザンハイブリダイゼーション法を含めた従来法は、何れも標識としてRIを用いるため、放射性物質取り扱い施設とその維持管理に多大な費用と労力を要するばかりではなく、取り扱い者の健康の点で問題がある。また、オートラジオグラフによって、バンドとして検出するためには、24時間以上の長時間を必要とし、試料DNAの量が少ない場合には、さらに時間を要し、バンドが不明確となる等の問題点を有する。

【0005】 一方、サザンハイブリダイゼーション法において、RIの代わりに蛍光を用いる方法も知られている。この方法は、安全性と迅速さにおいてRIより優れている。また、蛍光法による、スライドガラスやシリコン等の基板に多数のDNA分子を整列させたDNAチップ技術も既に実用化されている。しかし、励起光による褪色が起こること、測定には専用の蛍光測定装置が必要であること、蛍光の内部消光のために一定量以上の蛍光物質を導入することは困難であること等の欠点を有する。

【0006】 また、発光にてDNAを検出する方法も実用されているが、蛍光法と同様に測定に専用の発光測定装置が必要とされる。

【0007】 上記の問題点を解決する方法として、プローブDNAを電極型センサに適用する方法が開示されている（特開平9-288080号公報および第57回分析化学討論会稿旨集、p137~138（1996年））。即ち、出力端子を備えた電極であって、プローブDNAが固定されてなる電極と試料DNA（断片化が不要）とを、インターラーケータの存在下に反応させ、反応後の電極の電流を測定することにより、プローブDNAと試料DNAとで形成されるハイブリッドDNAの存在を検出あるいはハイブリッドDNAの量を測定する方法（以下、DNAセンサ法という）である。インターラーケータとしては、特に、酸化還元活性を持ったフェロセン化合物が用いられ、これは、ハイブリッドDNAに特

異的に結合することが知られている。

【0008】上記のDNAセンサ法では、リアルタイムでハイブリッドDNAの検出が簡便に高感度で行える。分画処理も不要で、蛍光色素の褪色という問題もない。本方法の装置は、プローブDNAが固定されてなる電極が一個のみである。即ち、そのプローブDNAが固定されてなる電極に、一本鎖に解離させた試料DNAを添加し、プローブDNAと反応させ、相補性を判断するものである。

【0009】しかし、遺伝子発現のモニタリング、DNA塩基配列の決定、遺伝子変異解析、遺伝子多型解析等を効率的に行うためには、上記のDNAセンサ法では、実用化レベルを十分満足するとは言い難い。従って、該DNAセンサ法をDNAチップ技術に近づけることが一つの解決策である。また、実用化レベルを満足するためには、そのDNAセンサ法よりさらに高い感度を有するDNAの検出方法の開発が望まれている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、プローブDNAと試料DNAとを、インターラーカレータ存在下に接触させ、プローブDNAと試料DNAとの結合で形成されたハイブリッドDNAに結合しているインターラーカレータに流れる電流を測定することにより接触後の電極の電流を測定することにより、特定の塩基配列を有するDNAを検出する方法を応用して、より検出感度の高いDNAの検出方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者の研究により、電極に固定されたプローブDNAと一本鎖に解離させた試料DNAとを、基質、その基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素、および電気化学活性縫い込み型インターラーカレータの存在下に接触させ、該プローブDNAと該試料DNAとの結合によって形成されたハイブリッドDNAに結合した該インターラーカレータに流れる電流を、還元型に変化した酸化酵素と電極との間の電子移動によって増幅させ、その電流を測定することによって特定の塩基配列を有するDNAを検出することからなるDNAの増感型検出方法が上記の課題を解決できることが判明した。

【0012】また、ハイブリッドDNAに、基質、その基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素、および電気化学活性縫い込み型インターラーカレータを接触させ、ハイブリッドDNAに結合した該インターラーカレータに流れる電流を、還元型に変化した酸化酵素と電極との間の電子移動によって増幅させ、その電流を測定することによってハイブリダイズした試料DNAの相補性を検出することからなるDNAの増感型検出方法も上記の課題を解決できることが判明した。

【0013】DNAの増感型検出方法の好ましい態様は、以下の通りである。

(1) プローブDNAの塩基配列が既知であって、そのプローブDNAを使用することを特徴とするDNAの増感型検出方法。

(2) 基質がグルコースもしくはコレステロールであって、その基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素がそれぞれグルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼであることを特徴とするDNAの増感型検出方法。

(3) 電気化学活性縫い込み型インターラーカレータが、酸化還元活性を有する化合物であることを特徴とするDNAの増感型検出方法。

(4) 電気化学活性縫い込み型インターラーカレータが、フェロセン修飾電気化学活性縫い込み型インターラーカレータであることを特徴とするDNAの増感型検出方法。

(5) 一本鎖に解離させた試料DNAが、 10^{-18} モル乃至 10^{-12} モルの範囲の量で使用することを特徴とするDNAの増感型検出方法。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明のDNAの増感型検出方法は、以下に説明する、増感効果を特に持たないDNAの検出方法を応用したものである。増感効果を特に持たないDNAの検出方法を本発明のDNAの増感型検出方法と区別するために、「DNAの非増感型検出方法」という。

【0015】DNAの非増感型検出方法の特徴は、電極表面にプローブDNAが固定されてなるDNAセンサ上にて、プローブDNAと一本鎖に解離させた試料DNAとを電気化学活性縫い込み型インターラーカレータ存在下に接触させ、形成したハイブリッドDNAに結合している該インターラーカレータに流れる電流を測定することによって、特定の塩基配列を有するDNAを検出することである。電極上で既にハイブリッドDNAが形成されているものに、該インターラーカレータを接触させてもよい。

【0016】DNAの増感型検出方法は、上記のDNAの非増感型検出方法の条件にさらに基質およびその基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素を存在させることによって、ハイブリッドDNAに結合した電気化学活性縫い込み型インターラーカレータに流れる電流を、還元型に変化した酸化酵素と電極との間の電子移動によって増幅させ、その電流を測定するという点が非増感型検出方法と異なる。

【0017】また、既に形成されているハイブリッドDNAに、酸化酵素、基質、および電気化学活性縫い込み型インターラーカレータを接触させ、該インターラーカレータに流れる電流を還元型に変化した酸化酵素と電極との間の電子移動によって増幅させ、その電流を測定することによってハイブリダイズした試料DNAの相補性を検出することも本発明のDNAの増感型検出方法が非増感型検出方法と異なる点である。

【0018】以下、本発明のDNAの増感型検出方法に

について詳細に説明する。

【0019】図1は、電気化学活性縫い込み型インターラーゲータ(3)が、還元型に変化した酸化酵素とハイブリッドDNA(2)が結合した電極(1)との間の電子移動反応を仲介する模式図である。即ち、電極(1)にチオール基を介して固定されてなるプローブDNAと試料DNAとで形成されたハイブリッドDNA(2)に、電気化学活性縫い込み型インターラーゲータ(3)が二つのフェロセン分子を二本鎖の外側に突出した状態で結合している。電流は、結合したインターラーゲータ(3)のフェロセン分子間を流れる。ここに、酸化酵素(4)およびその対象となる基質(SU)を存在させると、基質はその酸化体(OS)に変換される。発生する電子がフェロセン分子の方向へ流れると電流は増幅する。即ち、該インターラーゲータ(3)は、還元型に変化した酸化酵素と電極との間の電子移動反応を仲介している。

【0020】電極としては、DNAを固定できるものが好ましい。金、グラシーカーボンもしくは炭素を用いることが好ましい。電極の数は、二以上の複数であれば特に制限されない。

【0021】プローブDNAとしては、生物試料から抽出したDNAを制限酵素で切断し、電気泳動による分離等で精製したDNAあるいは化学合成で得られた一本鎖のDNAを用いることができる。生物試料から抽出したDNAの場合には、熱処理あるいはアルカリ処理によって、一本鎖のDNAに解離させておくことが好ましい。これら的一本鎖のDNAの配列は、周知のDNA配列決定法により、予め決定しておくことが好ましい。

【0022】上記の一本鎖のDNAは、電極に固定する。固定化方法としては、公知の方法が用いられる。電極が金である場合、該DNAの5'ーもしくは3'ー末端(好ましくは、5'ー末端)にチオール基を導入し、金とイオウとの配位結合を介して、該DNAが電極に固定される。該DNAにチオール基を導入する方法は、文献(M. Maeda et al., Chem. Lett., 1805~1808 (1994) およびB. A. Connolly, Nucleic Acids Res., 13, 4484 (1985))に記載されている。即ち、上記の方法によって得られたチオール基を有する該DNAを金電極に滴下し、低温下で数時間放置することにより該DNAが電極に固定され、プローブDNAが作成される。

【0023】電極がグラシーカーボンである場合、グラシーカーボンを過マンガン酸カリウムで酸化することによって、電極表面にカルボン酸基を導入する。次いで、該DNAは、アミド結合により電極表面に固定される。実際の固定化方法については、文献(K. M. Miller et al., Analytical Chemistry, 65, 2317~2323 (1993))に詳細が記載されている。

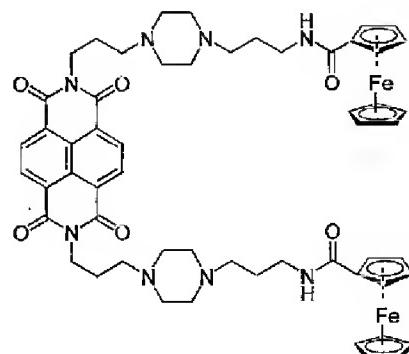
【0024】ハイブリダイゼーションは、電気活性縫い込み型インターラーゲータの存在下に行なうことが好ましい。該インターラーゲータは、数nM~数mMの濃度範囲で用いることが好ましい。該インターラーゲータは、プローブDNAと試料DNAとのハイブリダイゼーションの速度を促進すると共に、形成されたハイブリッドDNAに高い特異性で結合し、該ハイブリッドDNAを安定化する。このとき、該インターラーゲータとハイブリッドDNAとの複合体は、一次元マトリックスを支持体とした擬ポリフェロセンポリマー(フェロセン分子の擬ポリマー)と見なせる。このポリマー配列化が、還元型に変化したグルコースオキシダーゼと電極との間の電子移動反応の仲介を可能にしている。ハイブリッドDNAが形成されない場合には、該インターラーゲータは、一本鎖のDNAには結合しないか、あるいは一旦結合してもすぐに解離して遊離のインターラーゲータとなる。

【0025】電気化学活性縫い込み型インターラーゲータは、酸化還元活性を有する物質であり、かつハイブリッドDNAの二本鎖に縫い込まれる構造を有する物質であることが好ましい。酸化還元活性部分として好ましくは、フェロセン化合物、カテコールアミン化合物、金属ビビリジン錯体、金属フェナンスリン錯体もしくはビオローゲン化合物である。さらに好ましくは、フェロセン化合物である。縫い込み型インターラーゲータ部分として好ましくは、ナフタレンジイミド、アントラセン、アントラキノン等である。よって、好ましく用いられる該インターラーゲータは、フェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシニイミドエステルと対応するアミン体との反応により合成される下記式で表されるフェロセン化ナフタレンジイミド誘導体(S. Takenaka et al., J. Chem. Soc., Commun., 1111 (1998))である。

【0026】

【化1】

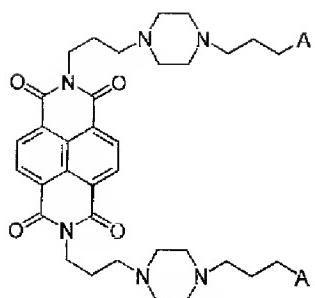
(NDIFe₂)



【0027】また、下記式で表されるフェロセン化ナフタレンジイミド誘導体も好ましく用いられる。

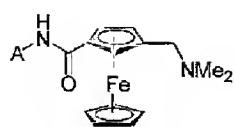
【0028】

【化2】



【0029】但し、Aは下記式で表されるフェロセン誘導体である。

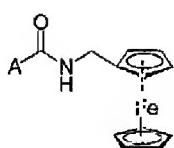
(A3)



【0032】

【化5】

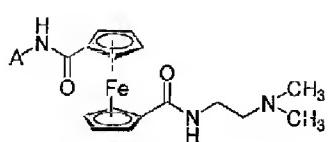
(A5)



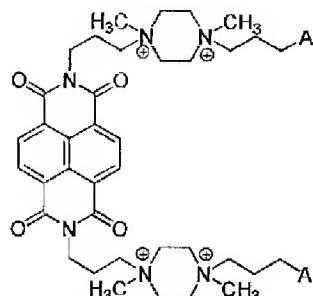
【0033】

【化6】

(A6)



(NDI^{c2}-1)

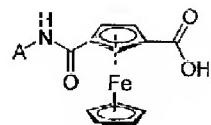


【0036】電気活性縫い込み型インターラーケータとして上記のナフタレンジイミド誘導体を用いた場合、ナフタレンジイミド誘導体は、二塩基おきに配列してハイブリッドDNAに飽和している。このことは、ナフタレンジイミド誘導体の二つのフェロセン部分が、それぞれ、ハイブリッドDNAの主溝と副溝とに密に並んだ状態を

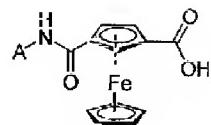
【0030】

【化3】

(A1)



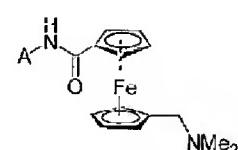
(A2)



【0031】

【化4】

(A4)

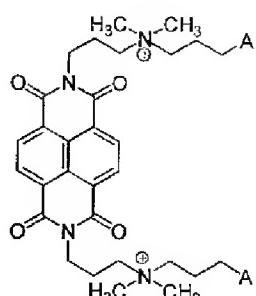


【0034】電気活性縫い込み型インターラーケータには、酸化還元活性部分と縫い込み型インターラーケータ部分とを繋ぐリンカー部分がある。上記式で表される1,4-ジプロピルビペラジン基がリンカー部分に相当する。このビペラジン基の代わりに、二価の四級アミン基を導入することもできる。四級アミン基を導入した下記式で表される化合物は、反応溶液中のpHに依らずカチオン性となるために、ハイブリッドDNAとの結合がより強くなる。リンカー部分に相当する基としては上記のものに限定されない。リンカー部分に相当する基の構造の違いにより、フェロセン分子の酸化還元電位が異なる。

【0035】

【化7】

(NDIFc₂-2)



意味している。このため、ナフタレンジイミド誘導体は、ハイブリッドDNAからの解離速度が極めて遅くなる。ここで、ナフタレンジイミド誘導体のハイブリッドDNAへの結合がインターラーションモードであることは、アレイにインターラーケータおよび試料DNAを添加したときに、粘度の変化が認められたことにより決定

した。閉環状プラスミド（例えば、ウイルスSV40）の場合、インターラーニングが起こると超らせんの変化に伴って粘度も変化することが知られている。

【0037】試料DNAは、囊胞性線維症等の遺伝病の患者より抽出したDNAを、熱処理あるいはアルカリ処理によって、一本鎖のDNAに解離させて使用することが好ましい。必要であれば、制限酵素で切断し、電気泳動による分離等で精製してもよい。制限酵素で切断を受けた試料DNAは、複数個のDNA断片となるが、プローブDNAとの接触に使用されるDNA断片は、一つであっても複数個であってもよい。試料DNAは、数 10^{-18} ～数 10^{-10} モルの範囲の量で用いられることが好ましい。数 10^{-18} ～数 10^{-12} モルの範囲の量で用いられることがさらに好ましい。

【0038】酸化酵素として用いる酵素は、酸素から過酸化水素を生じる2電子還元を行なう酵素であれば特に制限されない。グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ウリカーゼ、アミノオキシダーゼ等を好ましく使用することができる。グルコースオキシダーゼによって過酸化水素を発生する基質としては、グルコースを使用する。コレステロールオキシダーゼの場合には、基質としてコレステロールを使用する。

【0039】グルコースオキシダーゼは、Aspergillus nigerもしくはPenicillium notatum由来のものを用いることが好ましい。コレステロールオキシダーゼは、Nocardia erythroporos、Brevibacterium、Pseudomonas、Mycobacterium等から得られたものを用いることができる。

【0040】ハイブリダイゼーション終了後、電極を洗浄し、遊離のインターラーニングを除去しておくことが好ましい。

【0041】プローブDNAと試料DNAとの反応の結果は、電極に流れる電気量を測定することにより判断する。電気量の測定には、電位をかけて流れる電流を測定できる方法であれば何れの方法も用いることができる。サイクリックボルタムメトリー、デファレンシャルパルスボルタムメトリー、ポテンショスタット等が好ましく用いられる。

【0042】DNAの増感型検出方法では、グルコースおよびグルコースオキシダーゼの存在によって電極に流れる電流量は、存在させない場合に比較して20～100倍に増幅する。反応に使用する緩衝液あるいはスキャン速度を変えることにより、100倍以上の電流量の増幅も可能である。

【0043】

【実施例】【実施例1】

(1) プローブDNAが固定されてなる電極の作成
面積が 2.25 mm^2 の金電極に、5'一末端にメルカプトヘキシル基を有する150ピコモルのチミジンの2

0量体(dT_{20})；

5' -TTTTTTTTTTTTTTTTTT-

3'

の水溶液 $2\mu\text{L}$ を滴下し、プローブDNAを作成した。この金電極には、電極 2 mm^2 当たり20ピコモルの dT_{20} が固定されたことになる。 dT_{20} の合成および固定化については、文献(特開平9-288080号公報)に従って行った。

(2) フェロセン縫い込み型インターラーニングの合成
合成は、文献(同公報)に従って合成した。

(3) 試料DNAの合成

試料DNAとして、下記式で表されるアデニンの20量体(dA_{20})；

5' -AAAAAAAAAAAAAAA-

3'

を合成した。合成法については、上記文献に従った。

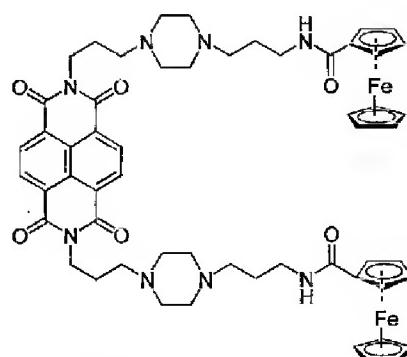
(4) 試料DNAの相補性の検出

上記(3)で得られた dA_{20} (286ピコモル)、下記式で表されるフェロセン縫い込み型インターラーニング($50\mu\text{M}$)、グルコース(1 mM)およびグルコースオキシダーゼ(*Aspergillus niger*由来、和光(株)製(200U)とを含む 0.1 M 酢酸-酢酸カリウム水溶液($\text{pH } 5.6$)～ 0.1 M 塩化カリウム水溶液の混合液に、 dT_{20} が固定された金電極を浸し、 25°C で20分間インキュベートさせた。インキュベート後、電極を引き上げ、電極を5秒間、 0.1 M リン酸二水素ナトリウム-リン酸水素二ナトリウム水溶液($\text{pH } 7.0$)にて洗浄し、遊離のインターラーニング、未反応の dA_{20} 、グルコースおよびグルコースオキシダーゼを除去した。この洗浄処理後の電極のサイクリックボルタモグラムを測定した(図2)。測定は、スキャン速度 $25\text{ mV}/\text{秒}$ にて行った。

【0044】

【化8】

(NDIFc₂)



【0045】[比較例1] グルコースおよびグルコースオキシダーゼを存在させなかつた以外は、実施例1と同様にして試料DNAの相補性の検出を行つた(図2)。

【0046】図2より、グルコースおよびグルコースオ

キシダーゼの存在下で増幅された電流（実線サイクリックボルタモグラム）は、電位514mVにおいて、 $-2.9\mu A$ であったのに対し、存在させない場合の電流（点線サイクリックボルタモグラム）は、 $-0.1\mu A$ であった。即ち、前者は、後者の29倍であることが分かった。

【0047】[実施例2] 試料DNA (dA_{20}) の濃度を変える以外は、実施例1と同様にして電極の性能の評価を行った（図3）。測定は、電位480mVにおいて行った。棒グラフ（41）は、試料DNA (dA_{20}) の濃度が10ピコモルであるときの電流値（ $3.2\mu A$ ）を、棒グラフ（42）は、濃度が20ピコモルであるときの電流値（ $3.6\mu A$ ）を示す。棒グラフ（41'）および棒グラフ（42'）は、それぞれ、グルコースおよびグルコースオキシダーゼを存在させない場合における、試料DNA (dA_{20}) の濃度が10ピコモルの電流値（ $0.4\mu A$ ）、20ピコモルの電流値（ $0.6\mu A$ ）を示す。

【0048】図3より、試料DNA (dA_{20}) の濃度が20ピコモルの場合には、グルコースおよびグルコースオキシダーゼを存在させると、存在させない場合に比べると60～80倍の範囲で増幅された電流値を示し、試料DNA (dA_{20}) の濃度を10ピコモルにしても、同様な効果が認められた。従って、グルコースおよびグルコースオキシダーゼを存在させることにより、試料DNAの濃度を下げても、高い検出感度で試料DNAの検出を行えることが分かった。

【0049】よって、図2および図3は、ハイブリッドDNAに結合したインターハーネスが、還元型に変化し

た酸化酵素と電極との間の電子移動を仲介したことにより電流が増幅されたことを示している。

【0050】

【発明の効果】本発明のDNAの増感型検出方法は、基質およびその基質との反応によって還元型に変化する酸化酵素を存在させない方法に比べて、20～100倍の範囲の高い検出感度を達成することができた。また、用いる試料DNAの濃度が数 10^{-18} ～数 10^{-12} モルの範囲の量であっても、試料DNAの定性・定量が充分に行えることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【図1】電気化学活性縫い込み型インターハーネスが、還元型に変化した酸化酵素とハイブリッドDNAが結合している電極との間の電子移動反応を仲介する模式図である。

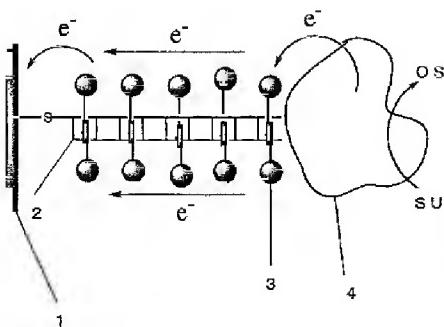
【図2】グルコースおよびグルコースオキシダーゼ存在下のサイクリックボルタモグラム、並びにグルコースおよびグルコースオキシダーゼが共に非存在下のサイクリックボルタモグラムである。

【図3】グルコースおよびグルコースオキシダーゼ在下での試料DNAの濃度とピーク電流値との関係を示す棒グラフ、並びにグルコースおよびグルコースオキシダーゼが共に非存在下での試料DNAの濃度とピーク電流値との関係を示す棒グラフである。

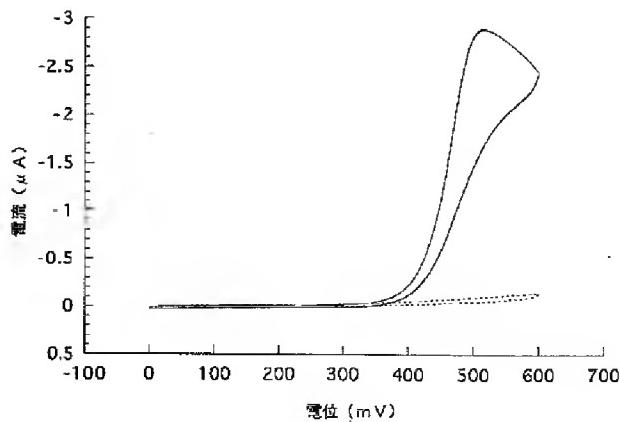
【符号の説明】

- 1 電極
- 2 ハイブリッドDNA
- 3 電気化学活性縫い込み型インターハーネス
- 4 酸化酵素

【図1】



【図2】



!(8) 000-146894 (P2000-146894A)

【図3】

